

JP06169780A**MicroPatent Report****GENE DNA PARTICIPATING IN INTEGRATION OF
MEMBRANE PROTEIN TO MEMBRANE**

<p>[71] Applicant: MITSUBISHI PETROCHEM CO LTD</p> <p>[72] Inventors: HONNO NOBUTAKE; KOBAYASHI MIKI; YUGAWA HIDEAKI</p> <p>[21] Application No.: JP04326927</p> <p>[22] Filed: 19921207</p> <p>[43] Published: 19940621</p> <p><u>Go to Fulltext</u></p>	<p>[No drawing]</p>
<p>[57] Abstract: PURPOSE: To obtain a gene DNA derived from coryneform bacteria effective for participating in an integration of membraneous protein to membrane. CONSTITUTION: A secY gene DNA is isolated from Brevibacterium flavum MJ-233. The base sequence of the gene is determined and stable plasmid pCRY 30-secY is formed in the coryneform bacteria having this gene DNA segment.</p> <p>[51] Int'l Class: C12N01531 C07K01300 C12N00121 C12N01577 C12P02102 C12N00121 C12R00113 C12P02102 C12R00113</p>	

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-169780

(43)公開日 平成 6年(1994) 6月21日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/31	Z N A			
C 0 7 K 13/00		8517-4H		
C 1 2 N 1/21		7236-4B		
15/77		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-326927	(71)出願人	000006057 三菱油化株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目 5 番 2 号
(22)出願日	平成 4 年(1992)12月 7 日	(72)発明者	谷野 信剛 茨城県稲敷郡阿見町中央 8 丁目 3 番 1 号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内
特許法第30条第 1 項適用申請有り 平成 4 年11月17日 社団法人日本生物工学会開催の「平成 4 年度日本生物工 学会大会」において文書をもって発表		(72)発明者	小林 幹 茨城県稲敷郡阿見町中央 8 丁目 3 番 1 号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内
		(72)発明者	湯川 英明 茨城県稲敷郡阿見町中央 8 丁目 3 番 1 号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内
		(74)代理人	弁理士 山本 隆也

(54)【発明の名称】 膜蛋白質の膜への組み込みに関与する遺伝子DNA

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 コリネ型細菌由来の膜蛋白質の膜への組み込みに関与する遺伝子DNAの提供。

【構成】 プレビバクテリウム・フラバムMJ-233からセックワイ (sec Y) 遺伝子DNAを単離し、この遺伝子の塩基配列を決定し、該遺伝子DNA断片を有するコリネ型細菌内で安定なプラスミド pCRY30-sec Yを構築した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌由来の膜蛋白質の膜への組み込みに関する遺伝子DNA。

【請求項2】 コリネ型細菌がブレヴィバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavu*m) MJ233である請求項1記載の遺伝子DNA。

【請求項3】 膜蛋白質の膜への組み込みに関与する遺伝子がセックワイ (secY) である請求項1記載の遺伝子DNA。

【請求項4】 次のDNA塩基配列で示されるセックワイ (secY) 遺伝子DNA。

```

GTGTCCGCCA TTATTCAGGC ATTCAAGGAC GCGATCTGC GTAAGAAGAT TTTCTTCACT 60
ATCGCAATGA TCGTTCTATA CCGCATCGGT GCGCAGATCC CTCCCCGGG AGTTGACTAT 120
GCAACGATTA GTGGTCGTCT GCGTGACTTG ACTCAGGATC AGTCAAGCGT TTATTCGCTG 180
ATTAACCTGT TTTCGGTGG AGCGCTGCTG CAGCTGTCCA TTTTGTCTAT TGGTATCATG 240
CCGTACATCA CCGCGTCTAT TATCGTGACG CTGCTGACTG TGGTTATTCC ACACTTTGAG 300
GAGTTGAAGA AGGAAGGCCA GTCTGGCCAG GCAAGATGA TGCAGTACAC CAGTACTTA 360
ACGGTTGCCT TGGCGTTGCT TCAGTCTTCG GGCATCGTCG CGTTGGCGGA CCGTGAGCAG 420
CTGCTTGGCG CAGGCATTCT GCTGCTGTCG GCTGATCGCA ACTTCTTGA CCTATTGTT 480
TTGGTCATCA CCATGACTGC GGGTCCAGTG CTTGTGATGT GGATGGGTGA GCTCATCAG 540
GAAAAGGGCG TAGGCAATGG TATGTCGCTG CTGATTTTCG CTGGTATCGC AACTCGCTC 600
CCAACTGATG GCATGAACAT TCTGGGCAAC TCCGGCGGCG TGGTTTTCG TGTGTTCTG 660
GCTTCGGTTC TGATCTGGT CATTGGTGT GTATTCGTTG AGCAGGGCCA GCGTGTATT 720
CCAGTGCACT ACGCAAAGCG CATGGTGGT CGTCGTCAGT ACGGTGGTTC TTCCACTTAC 780
CTGCCCTTGA AGGTCAACCA AGCTGGTGT ATCCCAGTGA TCTTCGGTC TTCTTGATT 840
TACATGCCAG TGCTGATTAC TCAGATCGTG AACTCTGGT CGCTGGAAGT GTCTGATAAC 900
TGGTGGCAGC GCAACATCAT TCGGCACCTG CAGACGCCTT CTCTCGGCA GTACATTGTT 960
TTGTACTTTG CACTGACCAT CTCTCTCTCT TACTTCTATG TTTCTGTTCA GTATGATCCA 1020
GCTGAGCAGG CTGAAAACAT GAAGAAGTAC GGCGGATTTA TCCCTGGTAT TCGTCCGGC 1080
CGTCCGACTG CTGAGTACTT GGGATTCGTC ATGAACCGCC TGCTGTTTGT TGGTTCCCTG 1140
TACCTGGCTG TCATTGCTGT GCTGCCAAAC ATTATGCTGG ATCTAGGTGT TGACGCCGT 1200
TCGGCCGGAG CAACTCCATT CGCGGAACC GCAATCTTGA TTCTTGATC TGTGCACTG 1260
ACCACAGTGA AGCAGATTGA GAGCAGCTC CTGCAAGCA ACTACGAAGG ACTTCTAAAA 1320
TAA

```

【請求項5】 次のアミノ酸配列で示されるセックワイ (secY) 遺伝子DNA。

```

Val Ser Ala Ile Ile Gln Ala Phe Lys Asp Ala Asp Leu Arg Lys Lys
1           5           10          15
Ile Phe Phe Thr Ile Ala Met Ile Val Leu Tyr Arg Ile Gly Ala Gln
20          25          30
Ile Pro Ser Pro Gly Val Asp Tyr Ala Thr Ile Ser Gly Arg Leu Arg
35          40          45
Asp Leu Thr Gln Asp Gln Ser Ser Val Tyr Ser Leu Ile Asn Leu Phe
50          55          60
Ser Gly Gly Ala Leu Leu Gln Leu Ser Ile Phe Ala Ile Gly Ile Met
65          70          75          80
Pro Tyr Ile Thr Ala Ser Ile Ile Val Gln Leu Leu Thr Val Val Ile
85          90          95
Pro His Phe Glu Glu Leu Lys Lys Glu Gly Gln Ser Gly Gln Ala Lys
100         105         110
Met Met Gln Tyr Thr Arg Tyr Leu Thr Val Ala Leu Ala Leu Leu Gln
115         120         125
Ser Ser Gly Ile Val Ala Leu Ala Asp Arg Glu Gln Leu Leu Gly Ala
130         135         140
Gly Ile Arg Val Leu Ser Ala Asp Arg Asn Phe Phe Asp Leu Ile Val
145         150         155         160

```

Leu Val Ile Thr Met Thr Ala Gly Ala Val Leu Val Met Trp Met Gly
 165 170 175
 Glu Leu Ile Thr Glu Lys Gly Val Gly Asn Gly Met Ser Leu Leu Ile
 175 180 185
 Phe Ala Gly Ile Ala Thr Arg Leu Pro Thr Asp Gly Met Asn Ile Leu
 190 195 200
 Gly Asn Ser Gly Gly Val Val Phe Ala Val Val Leu Ala Ser Val Leu
 205 210 215
 Ile Leu Val Ile Gly Val Val Phe Val Glu Gln Gly Gln Arg Arg Ile
 220 225 230 235
 Pro Val Gln Tyr Ala Lys Arg Met Val Gly Arg Arg Gln Tyr Gly Gly
 240 245 250
 Ser Ser Thr Tyr Leu Pro Leu Lys Val Asn Gln Ala Gly Val Ile Pro
 255 260 265
 Val Ile Phe Ala Ser Ser Leu Ile Tyr Met Pro Val Leu Ile Thr Gln
 270 275 280
 Ile Val Asn Ser Gly Ser Leu Glu Val Ser Asp Asn Trp Trp Gln Arg
 285 290 295
 Asn Ile Ile Ala His Leu Gln Thr Pro Ser Ser Trp Gln Tyr Ile Val
 300 305 310 315
 Leu Tyr Phe Ala Leu Thr Ile Phe Phe Ser Tyr Phe Tyr Val Ser Val
 320 325 330
 Gln Tyr Asp Pro Ala Glu Gln Ala Glu Asn Met Lys Lys Tyr Gly Gly
 335 340 345
 Phe Ile Pro Gly Ile Arg Pro Gly Arg Pro Thr Ala Glu Tyr Leu Gly
 350 355 360
 Phe Val Met Asn Arg Leu Leu Phe Val Gly Ser Leu Tyr Leu Ala Val
 365 370 375
 Ile Ala Val Leu Pro Asn Ile Met Leu Asp Leu Gly Val Asp Ala Gly
 380 385 390 400
 Ser Ala Gly Ala Thr Pro Phe Gly Gly Thr Ala Ile Leu Ile Leu Val
 405 410 415
 Ser Val Ala Leu Thr Thr Val Lys Gln Ile Glu Ser Gln Leu Leu Gln
 420 425 430
 Ser Asn Tyr Glu Gly Leu Leu Lys
 435 440

【請求項6】 請求項1～5のいずれかに記載の遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項1～5のいずれかに記載の遺伝子DNAと、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNAを保有する組換えプラスミド。

【請求項8】 請求項7記載のプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、コリネ型細菌由来の膜蛋白質の膜への組み込みに関与する遺伝子DNAに関し、さらに詳しくは膜蛋白質の膜への組み込みに関与する主要な遺伝子の1つセックワイ (secY) 遺伝子に関する。secY遺伝子産物は、膜蛋白質、分泌蛋白質

が各々、細胞膜内へ組み込まれる、菌体外へ分泌される過程に必要不可欠な遺伝子である。該遺伝子を利用することにより、膜蛋白質の膜中含量の増加、分泌蛋白質の菌体外分泌量の増加が期待される。また、膜蛋白質、例えば酸化還元酵素の含量増加により、高活性を有する高性能生体触媒として菌体を利用し、部位特異的酸化還元等による様々の物質生産に応用することが可能である。

【0002】

【従来の技術】 蛋白質の膜への組み込み及び分泌に関する機構は、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) においてよく研究されており [Annual Review Genetics 24, 215-248, 1990. Annual Review of Biochemistry, 60, 101-124,

1991]、蛋白質の膜への組み込みに関する遺伝子としてsecA [Journal of Bacteriology, 150, 686-691, 1982]、secB [Journal of Bacteriology, 154, 254-260, 1983]、secD [Journal of Bacteriology, 169, 1286-1290, 1987]、secE [Genetics; 118, 571-579, 1988]、secF [EMBO Journal, 9, 3209-3216, 1990]、secY [Nucleic Acids Research, 11, 2599-2616, 1983]等が知られている。

【0003】これらの中でsecA, E, Y遺伝子は、各種変異株を用いた研究により蛋白質の膜への組み込みに特に重要な役割を演じていることが示されている。上記secY遺伝子としては、エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 由来の遺伝子 [Nucleic Acids Research, 11, p. 2599-2616, 1983参照]、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) 由来の遺伝子 [Journal of Biochemistry, 107, p. 603-607, 1990参照]等が単離されている。しかしながら、産業上重要な細菌であるコリネ型細菌由来のsecY遺伝子については、従来の報告例は見当たらない。

【0004】一般に、膜蛋白質は細胞膜中より抽出した場合不安定であり、生体触媒として利用するには限界がある。特定膜蛋白質の膜中含量のみを増加させることが可能であれば、高含量の膜、もしくは微生物自体を触媒として利用することができる。しかしながら、膜蛋白質を微生物細胞内で高発現させても、細胞質内でインクルージョン・ボディ (inclusion body) を形成し、細胞膜内へ組み込まれない。膜蛋白質を高発現させ、膜内に安定に保持させるためには、蛋白質の膜への組み込み系を強化する必要があると考えられるが、コリネ型細菌由来の膜組み込み系についての知見がなく、また、多種由来の膜組み込み系は、コリネ型細菌中で十分に機能しないと考えられる [Molecular Microbiology, 4, 305-314, 1990, FEBS Letters, 273, 75-78, 1990参照]。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、上記問題点を解決すべく、鋭意研究を重ねた結果、コリネ型細菌由来の膜蛋白質の膜への組み込みに関与する遺伝子を単離し、改変することにより、特定膜蛋白質の膜中含量増加を達成できると考え、コリネ型細菌由来の膜蛋白質の膜への組み込みに関与する主要な遺伝子であるsecY遺伝子DNAを単離することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0006】

【課題を解決するための手段】かくして本発明によれば、(1)コリネ型細菌由来の膜蛋白質の膜への組み込みに関与する遺伝子DNA、(2)該遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド及び(3)該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌が提供される。

【0007】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本発明の「膜蛋白質の膜への組み込みに関与する遺伝子DNA」とは、細胞膜中蛋白質の膜への組み込み、菌体外分泌蛋白質の分泌に関与する装置を構成する主要成分をコードする遺伝子DNAを意味するものである。該主要成分をコードする遺伝子DNAであるsecY遺伝子DNAを含むDNA断片(以下、これを「A断片」と略称することがある)は、その塩基配列が決定された後においては合成することも可能であるが、通常は微生物からクローニングされる場合が多く、その供給源となる微生物としては、コリネ型細菌が有利に使用される。

【0008】これらの供給源微生物からA断片を調製するための基本操作の一例を述べれば次のとおりである：A断片は、上記コリネ型細菌、例えばブレヴィバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497) 株の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で、分離取得することができる。

【0009】まず、ブレヴィバクテリウム・フラバム MJ-233 株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばEcoRIを用いて染色体DNAを完全に分解する。得られるDNA断片をクローニングベクター、例えばpUC118 (宝酒造製) に挿入し、このベクターを用いてエシエリヒア・コリ JM109 (宝酒造製) を形質転換し、形質転換体を取得する。

【0010】得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、エシエリヒア・コリ、バチルス・サチルス由来secY遺伝子の共通領域配列をプローブとして用いるサザンハイブリダイゼーションにより、挿入されたブレヴィバクテリウム・フラバム MJ-233 株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。かくして得られるA断片をさらに適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を同種のベクターに挿入し、エシエリヒア・コリ JM109 を形質転換する。得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、ハイブリダイゼーションにより挿入されたブレヴィバクテリウム・フラバム MJ-233 株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。

【0011】このようにして得られるA断片の一つは、上記ブレヴィバクテリウム・フラバム MJ-233 株の染色体DNAを制限酵素EcoRIの完全分解により切り出し、さらにそれを制限酵素KpnIで切断又は制限酵

素KpnIで直接切断することによって得られる大きさが約1.5kbのDNA断片を挙げることができる。この約1.5kbのsecY遺伝子DNAを含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記第1表に示す。

【0012】

【表1】

第1表

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BalI	1	0.4, 1.1
PstI	2	0.3, 0.5, 0.7
SacI	1	0.6, 0.9
SmaI	1	0.2, 1.3

【0013】なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0014】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダファージ (λ phage) のDNAを制限酵素HindIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ (φ x174 phage) のDNAを制限酵素HaeIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片のそれぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1kbから1kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0015】一方、上記のプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素EcoRI、KpnIによって切断又は制限酵素KpnIで直接切断することにより得られる大きさが約1.5kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119 (宝酒造製) を用いるジデオキシスクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination法、Sanger, F. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 74, 5463, 1977) により決定することができる。このようにして決定した上記約1.5kbのDNA断片の塩基配列のオープンリーディングフレームの

存在から決定したsecY遺伝子DNAは、後記配列表の配列番号1に示す配列を有するものであり、440個のアミノ酸をコードする1320の塩基対から構成される。

【0016】上記の塩基配列を包含する本発明のsecY遺伝子を含むDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製System-1 Plusを用いて合成されたものであってもよい。

【0017】また、前記の如くプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから取得される本発明の膜蛋白質の膜への組み込みに関する遺伝子DNAは、secY遺伝子産物の機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明の遺伝子DNAに包含されるものである。

【0018】以上に詳述した大きさが約1.5kbのDNA断片の制限酵素による切断点地図を図1に示す。本発明のsecY遺伝子DNAを含むDNA断片 (A断片) は、適当なプラスミド、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でsecY遺伝子産物の高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0019】また、本発明のsecY遺伝子を発現させるためのプロモーターはコリネ型細菌が保有するプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、secY遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であればいかなるプロモーターであってもよい。

【0020】本発明のA断片を導入することができる、コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2及びpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ184；特開昭57-134500号に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG11等を挙げることができる。

【0021】中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を持つものが好ましく、例えば、プラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX等が好適に使用される。

【0022】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、Brevibacterium stationis) IFO12144 (FERM BP-2515) からプラスミドpBY503 (このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照) DNAを抽出し、制限酵素XhoIで大きさが約4.0 kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1 kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出す。これらの両断片をプラスミドpHSG298 (宝酒造製) のEcoRI-KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0023】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えばプラスミドベクター中に1箇所だけ存在する制限酵素部位を、該制限酵素で開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下にDNAリガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。

【0024】プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIで開裂させ、そこに前記secY遺伝子DNAを含むDNA断片 (A断片) をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。このようにして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約1.5 kbのA断片を導入した組換えプラスミドをpCRY30-secYと命名した。プラスミドpCRY30-secYの作成方法の詳細については、後記実施例4で説明する。

【0025】本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41 (FERM BP-1498)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11 (FERM BP-1500)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21 (FERM BP-1499) 等が挙げられる。

【0026】なお、上記のFERM BP-1498の

菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてDL- α -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール酸化性微生物である (特公昭59-28398号公報第3~4欄参照)。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- α -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である (特開昭62-5198号公報参照)。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERMBP-1497の菌株を親株としたD- α -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である (特開昭61-177993号公報参照)。

【0027】これらの微生物の他に、プレビバクテリウム・アンモニアゲネス (Brevibacterium ammoniagenes) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746; プレビバクテリウム・デバリカタム (Brevibacterium divaricatum) ATCC14020; プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (Brevibacterium lactofermentum) ATCC13869; コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ATCC31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0028】なお、宿主としてプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502 (特開昭63-36787号公報参照) のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である [Bact. Rev. 36 p. 361~405 (1972) 参照]。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0029】宿主プレビバクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ (濃度: 0.2~50 μ g/ml) もしくはエチジウムブロミド (濃度: 0.2~50 μ g/ml) 等を含む培地に、1ml当たり約10細胞になるように植菌し、生育を不完全に阻害しながら約24時間約35℃で培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約35℃で約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミドpBY502が除去されたプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株が得られる。

【0030】このようにして得られるプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、エシェリヒア・コリ及びエルビ

ニア・カロトボラについて知られているように [Calvin, N. M. and Hanawalt, P. C., Journal of Bacteriology, 170, 2796 (1988); Ito, K., Nishida, T. and Izaki, K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293 (1988) 参照]、DNA受容菌へのパルス波通電 [Sato, Y. et al., Journal of Industrial Microbiology, 5, 159 (1990) 参照] によりプラスミドを導入することが可能である。

【0031】上記の方法で形質転換して得られる sec Y 遺伝子産物産性能を有するコリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバム MJ-233 由来株の培養方法を以下に述べる。培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、蔗糖等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステイーブリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

【0032】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気条件下に、約 20～約 40℃、好ましくは約 25℃～約 35℃の温度で行うことができる。培養途中の pH は 5～10、好ましくは 7～8 付近とすることができ、培養中の pH 調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは 1～5 容量%、更に好ましくは 2～3 容量%である。また、培養期間は通常 1～7 日間とすることができ、最適期間は 3 日間である。

【0033】かくして得られる培養物から遠心分離等により菌体を集めることにより、sec Y 遺伝子産物を高含有する菌体を取得することができる。

【0034】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。

実施例 1

プレバクテリウム・フラバム MJ-233 由来の sec Y 遺伝子 DNA を含む DNA 断片 (A 断片) のクローニング

(A) プレバクテリウム・フラバム MJ-233 の全 DNA の抽出

半合成培地 A 培地 [組成: 尿素 2 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 KH_2PO_4 0.5 g、 MgSO_4 0.5 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6 mg、

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ 6 mg、酵母エキス 2.5 g、カザミノ酸 5 g、ビオチン 200 μg 、塩酸チアミン 200 μg 、グルコース 20 g、蒸留水 1 l] 1 l に、プレバクテリウム・フラバム MJ-233 (FERM BP-1497) を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を 10 mg/ml の濃度にリゾチームを含む 10 mM NaCl-20 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) -1 mM EDTA-2 Na 溶液 15 ml に懸濁した。次にプロテナーゼ K を、最終濃度が 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、37℃で 1 時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が 0.5% になるように添加し、50℃で 6 時間保温して溶菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で 10 分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離 (5,000 \times g、20 分間、10～12℃) し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを 0.3 M となるように添加した後、2 倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在する DNA をガラス棒でまきとり、70% エタノールで洗浄した後、風乾した。得られた DNA に 10 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) -1 mM EDTA-2 Na 溶液 5 ml を加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0035】(B) 組換え体の創製

上記 (A) 項で得たプレバクテリウム・フラバム MJ-233 の全 DNA 溶液の 90 μl を制限酵素 EcoRI 50 units を用い、37℃で 1 時間反応させ完全分解した。この EcoRI 分解 DNA にクローニングベクター pUC118 (宝酒造より市販) を制限酵素 EcoRI で切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP、10 mM MgCl_2 及び T_4 DNA リガーゼ 1 unit の各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で 15 時間反応させ、結合させた。

【0036】上記 (B) 項で得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) によりエシェリヒア・コリ JM109 (宝酒造製) を形質転換し、アンピシリン 50 mg を含む培地 [トリプトン 10 g、イーストエキストラクト 5 g、NaCl 5 g 及び寒天 16 g を蒸留水 1 l に溶解] に塗抹した。

【0037】この培地上的の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミド DNA を抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲルを用いて泳動した。このアガロースゲルより DNA をナイロンメンブレン上に移しとり、エシェリヒア・コリ、バチルスサチルス由来 sec Y 遺伝子の共通領域をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行なった。用いたプロ

ープとしては、エシェリヒア・コリ、バチルス・サチルス由来のsecY遺伝子から推定されるアミノ酸配列で特に相同性の高い領域に注目し、そのアミノ酸配列より想定される混合オリゴヌクレオチドプローブをアプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製394 DNA/RNAシンセサイザー (synthesizer) を用いて合成した。

【0038】実際に用いたプローブの塩基配列は、次のアミノ酸配列：

Ala Gly Val Ile Pro Val Ile Phe Ala

より想定される下記の塩基配列：

GCT GGI GTI ATH CCI GTI ATH TTY GC

(配列中、HはA又はC又はT、YはC又はTを示し、ここでAはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシン、Tはチミン、Iはデオキシイノシンを示す。) の26mer (26塩基対) である。なお、プローブの合成にあたっては、混合の度合が著しく不揃いになりすぎないようにデオキシイノシンを用いた。

【0039】合成した上記オリゴヌクレオチドプローブをT4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) を用いる手法で、5'末端リン酸基を[γ-³²P] ATPでラジオアイソトープラベルした [Analytical Biochemistry, 158, 307-315, 1986]。サザンハイブリダイゼーションは、常法 [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] の通り行なった。この結果、ポジティブなバンドを生ずるクローンを選定することができ、プラスミドpUC118の長さ3.2kbのDNA断片に加え、長さ約4.2kbの挿入断片が認められた。

【0040】本プラスミドをpUC118-Y-fragと命名した。

(D) secY DNA遺伝子を含むDNA断片 (A) 断片のサブクロニング

第2表 プラスミドpUC118-secY

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamHI	1	4.7
SacI	2	4.1, 0.6
PstI	3	3.5, 0.7, 0.5

【0046】上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpUC118-secYと命名した。以上によりsecY遺伝子DNAを含む大きさが約1.5kbのDNA断片 (KpnI断片) を得ることができた。

【0047】実施例2

secY遺伝子DNAの塩基配列の決定

実施例1の (D) 項で得られたsecY遺伝子DNAを含む長さが約1.5kbのDNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119

(宝酒造製) を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法

上記 (C) 項で得たプラスミドpUC118-Y-fragに含まれるDNA挿入断片を、必要な部分だけに小型化するために、プラスミドpUC118 (宝酒造より市販) へsecY遺伝子DNAを含むDNA断片を下記のとおりサブクロニングした。

【0041】上記 (C) 項で得たプラスミドpUC118-Y-fragを制限酵素KpnIで切断したものと、プラスミドpUC118を制限酵素KpnIで切断したものを混合し、50mMトリス緩衝液 (pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂ 及びT4DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ、結合させた。

【0042】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) により前記エシェリヒア・コリJM109を形質転換し、アンピシリン50mgを含む培地 [トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl 5g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解] に塗抹した。

【0043】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、ハイブリダイゼーション法を用いて調べたところ、プラスミドpUC118の長さ3.2kbのDNA断片に加え、長さ約1.5kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限酵素で切断したときの、長さ約1.5kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表1に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。

【0044】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の第2表に示す。

【0045】

【表2】

(dideoxy chain termination 法) (Sanger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977) により図2に示した戦略図に従って決定した。

【0048】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、secY遺伝子DNAは、後記配列表の配列番号1に示す塩基配列を有する440個のアミノ酸をコードする1320の塩基対より構成されていることが判明した。

【0049】実施例3

コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクター pCRY30 の作成

(A) プラスミド pBY503 の調製

プラスミド pBY503 は、プレバクテリウム・スタチオニス IFO12144 (FERM BP-2515) から分離された分子量約 10 メガダルトンのプラスミドであり、特開平 1-95785 号公報に記載のようにして調製した。

【0050】 半合成培地 A 培地 [尿素 2 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 KH_2PO_4 0.5 g、 MgSO_4 0.5 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6 mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ 6 mg、酵母エキス 2.5 g、カザミノ酸 5 g、ピチオン 200 μg 、塩酸チアミン 200 μg 、グルコース 20 g 及び蒸留水 1 l] 1 l に、プレバクテリウム・スタチオニス IFO12144 を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を 10 mg/ml の濃度にリゾチームを含む緩衝液 [25 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、10 mM EDTA、50 mM グルコース] 20 ml に懸濁し、37℃ で 1 時間反応させた。反応液にアルカリ SDS 液 [0.2 N NaOH、1% (W/V) SDS] 40 ml を添加し、緩やかに混和して室温にて 15 分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液 [5 M 酢酸カリウム溶液 60 ml、酢酸 1 l、5 ml、蒸留水 28.5 ml の混合液] 30 ml を添加し、充分混和してから氷水中に 15 分間静置した。

【0051】 溶菌物全量を遠心管に移し、4℃ で 10 分間、15,000 $\times g$ の遠心分離にかけ、上澄液を得た。これに等量のフェノール-クロロホルム液 (フェノール:クロロホルム = 1:1 混和液) を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で 5 分間、15,000 $\times g$ の遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に 2 倍量のエタノールを加え、-20℃ で 1 時間静置後、4℃ で 10 分間、15,000 $\times g$ の遠心分離にかけ、沈澱を回収した。

【0052】 沈澱を減圧乾燥後、TE 緩衝液 [トリス 10 mM、EDTA 1 mM; HCl にて pH 8.0 に調整] 2 ml に溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液 [5 倍濃度の TE 緩衝液 100 ml に塩化セシウム 170 g を溶解させた液] 15 ml と 10 mg/ml エチジウムブロマイド溶液 1 ml を加えて、密度を 1.392 g/ml に合わせた。この溶液を 12℃ で 42 時間、116,000 $\times g$ の遠心分離を行った。

【0053】 プラスミド pBY503 は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見いだされる。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミド pBY503 を含む分画液を得た。次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで 4 回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後 TE 緩衝

液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミド pBY503 を含む透析液に 3 M 酢酸ナトリウム溶液を最終濃度 30 mM に添加した後、2 倍量エタノールを加え、-20℃ で 1 時間静置した。この溶液を 15,000 $\times g$ の遠心分離にかけて DNA を沈降させ、プラスミド pBY503 を 50 μg 得た。

【0054】 (B) プラスミドベクター pCRY30 の作成

プラスミド pHSG298 (宝酒造製) 0.5 μg に制限酵素 SalI (5 units) を 37℃ で 1 時間反応させ、プラスミド DNA を完全に分解した。前記 (A) 項で調製したプラスミド pBY503 の 2 μg に制限酵素 XhoI (1 unit) を 37℃ で 30 分間反応させ、プラスミド DNA を部分分解した。両者のプラスミド DNA 分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために 65℃ で 10 分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々 50 mM トリス緩衝液 pH 7.6、10 mM MgCl_2 、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP 及び T4 DNA リガーゼ 1 unit になるように各成分を強化し、16℃ で 15 時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリ JM109 コンビテントセル (宝酒造製) を形質転換した。

【0055】 形質転換株は 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (最終濃度) のカナマイシン、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (最終濃度) の IPTG (イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (最終濃度) の X-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド) を含む L 培地 (トリプトン 10 g、酵母エキス 5 g、NaCl 5 g 及び蒸留水 1 l、pH 7.2) で 37℃ にて 24 時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ SDS 法 [T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, "Molecular cloning" (1982), 90-91 参照] により抽出した。

【0056】 その結果、プラスミド pHSG298 の SalI 部位にプラスミド pBY503 由来の約 4.0 kb の断片が挿入されたプラスミド pHSG298-ori が得られた。次に同様の方法を用い、前記 (A) 項で得られたプラスミド pBY503 DNA を制限酵素 KpnI 及び EcoRI にて処理して得られる約 2.1 kb の DNA 断片を上記プラスミド pHSG298-ori の KpnI 及び EcoRI 部位にクローニングし、プラスミドベクター pCRY30 を調製した。

【0057】 実施例 4

プラスミド pCRY30-secY の作成及びコリネ型細菌への導入

実施例 1 の (C) 項で得られたプラスミド pUC118-secY 5 μg を制限酵素 KpnI を各 5 units

用い、37℃で1時間反応させ分解したものと、実施例3の(B)項で得られたプラスミドpCRY30 1μgを制限酵素KpnI 1unitを用い、37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂ およびT4DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシェリヒア・コリJM109株を形質転換し、カナマイシン50μg/mlを含む培地〔トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl 5g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解〕に塗抹した。

【0058】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6kbのDNA断片に加え、大きさ1.5kbの挿入DNA断片が認められた。上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。

【0059】形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。プレバクテリウム・フラバムMJ-23

3 (FERM BP-1497) プラスミドpBY502除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlのバルス用溶液(272mM Sucrose、7mM KH₂PO₄、1mM MgCl₂; pH7.4)にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離して集め、5mlのバルス用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50μlとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーンバルサー(バイオラド社製)を用いて、2500ボルト、25μFDに設定し、パルスを印加後水中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15μg/ml(最終濃度)を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例3(A)項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の第3表に示す。

【0060】

【表3】

第3表 プラスミドpCRY30-secY

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(kb)
EcoRI	1	10.1
BamHI	1	10.1
KpnI	2	8.6, 1.5
XhoI	1	10.1

【0061】上記制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-secYと命名した。なお、プラスミドpCRY30-secYにより形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ233-secYは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院微生物工業技術研究所に、平成4年11月24日付で：微工研菌寄第13302号(FERM-13302)として寄託されている。

【0062】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：1320

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレバクテリウム フラバム

株名：MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-1320

特徴を決定した方法：P

配列

```

GTG TCC GCC ATT ATT CAG GCA TTC AAG GAC GCC GAT CTG CGT AAG AAG
Val Ser Ala Ile Ile Gln Ala Phe Lys Asp Ala Asp Leu Arg Lys Lys
1          5          10          15
ATT TTC TTC ACT ATC GCC ATG ATC GTT CTA TAC CGC ATC GGT GCG CAG
Ile Phe Phe Thr Ile Ala Met Ile Val Leu Tyr Arg Ile Gly Ala Gln
20          25          30
ATC CCT TCC CCG GGA GTT GAC TAT GCA ACG ATT AGT GGT CGT CTG CGT
Ile Pro Ser Pro Gly Val Asp Tyr Ala Thr Ile Ser Gly Arg Leu Arg
35          40          45
GAC TTG ACT CAG GAT CAG TCA AGC GTT TAT TCG CTG ATT AAC CTG TTT

```

Asp Leu Thr Gln Asp Gln Ser Ser Val Tyr Ser Leu Ile Asn Leu Phe
 50 55 60
 TCC GGT GGA GCG CTG CTG CAG CTG TCC ATT TTT GCT ATT GGT ATC ATG
 Ser Gly Gly Ala Leu Leu Gln Leu Ser Ile Phe Ala Ile Gly Ile Met
 65 70 75 80
 CCG TAC ATC ACG GCG TCT ATT ATC GTG CAG CTG CTG ACT GTG GTT ATT
 Pro Tyr Ile Thr Ala Ser Ile Ile Val Gln Leu Leu Thr Val Val Ile
 85 90 95
 CCA CAC TTT GAG GAG TTG AAG AAG GAA GGC CAG TCT GGC CAG GCC AAG
 Pro His Phe Glu Glu Leu Lys Lys Glu Gly Gln Ser Gly Gln Ala Lys
 100 105 110
 ATG ATG CAG TAC ACC AGG TAC TTA ACG GTT GCC TTG GCG TTG CTT CAG
 Met Met Gln Tyr Thr Arg Tyr Leu Thr Val Ala Leu Ala Leu Leu Gln
 115 120 125
 TCT TCG GGC ATC GTC GCG TTG GCG GAC CGT GAG CAG CTG CTT GGC GCA
 Ser Ser Gly Ile Val Ala Leu Ala Asp Arg Glu Gln Leu Leu Gly Ala
 130 135 140
 GGC ATT CGC GTG CTG TCG GCT GAT CGC AAC TTC TTC GAC CTC ATT GTT
 Gly Ile Arg Val Leu Ser Ala Asp Arg Asn Phe Phe Asp Leu Ile Val
 145 150 155 160
 TTG GTC ATC ACC ATG ACT GCG GGT GCA GTG CTT GTG ATG TGG ATG GGT
 Leu Val Ile Thr Met Thr Ala Gly Ala Val Leu Val Met Trp Met Gly
 165 170 175
 GAG CTC ATC ACG GAA AAG GGC GTA GGC AAT GGT ATG TCG CTG CTG ATT
 Glu Leu Ile Thr Glu Lys Gly Val Gly Asn Gly Met Ser Leu Leu Ile
 175 180 185
 TTC GCT GGT ATC GCA ACT CGC CTC CCA ACT GAT GGC ATG AAC ATT CTG
 Phe Ala Gly Ile Ala Thr Arg Leu Pro Thr Asp Gly Met Asn Ile Leu
 190 195 200
 GGC AAC TCC GGC GGC GTG GTT TTC GCT GTT GTT CTG GCT TCC GTT CTG
 Gly Asn Ser Gly Gly Val Val Phe Ala Val Val Leu Ala Ser Val Leu
 205 210 215
 ATC CTG GTC ATT GGT GTT GTA TTC GTT GAG CAG GGC CAG CGT CGT ATT
 Ile Leu Val Ile Gly Val Val Phe Val Glu Gln Gly Gln Arg Arg Ile
 220 225 230 235
 CCA GTG CAG TAC GCA AAG CGC ATG GTG GGT CGT CGT CAG TAC GGT GGT
 Pro Val Gln Tyr Ala Lys Arg Met Val Gly Arg Arg Gln Tyr Gly Gly
 240 245 250
 TCT TCC ACT TAC CTG CCT TTG AAG GTC AAC CAA GCT GGT GTT ATC CCA
 Ser Ser Thr Tyr Leu Pro Leu Lys Val Asn Gln Ala Gly Val Ile Pro
 255 260 265
 GTG ATC TTC GCG TCT TCC TTG ATT TAC ATG CCA GTG CTG ATT ACT CAG
 Val Ile Phe Ala Ser Ser Leu Ile Tyr Met Pro Val Leu Ile Thr Gln
 270 275 280
 ATC GTG AAC TCT GGT TCG CTG GAA GTG TCT GAT AAC TGG TGG CAG CGC
 Ile Val Asn Ser Gly Ser Leu Glu Val Ser Asp Asn Trp Trp Gln Arg
 285 290 295
 AAC ATC ATT GCG CAC CTG CAG ACG CCT TCT TCC TGG CAG TAC ATT GTT
 Asn Ile Ile Ala His Leu Gln Thr Pro Ser Ser Trp Gln Tyr Ile Val
 300 305 310 315

TTG TAC TTT GCA CTG ACC ATC TTC TTC TCT TAC TTC TAT GTT TCT GTT
 Leu Tyr Phe Ala Leu Thr Ile Phe Phe Ser Tyr Phe Tyr Val Ser Val
 320 325 330
 CAG TAT GAT CCA GCT GAG CAG GCT GAA AAC ATG AAG AAG TAC GGC GGA
 Gln Tyr Asp Pro Ala Glu Gln Ala Glu Asn Met Lys Lys Tyr Gly Gly
 335 340 345
 TTT ATC CCT GGT ATT CGT CCG GGC CGT CCG ACT GCT GAG TAC TTG GGA
 Phe Ile Pro Gly Ile Arg Pro Gly Arg Pro Thr Ala Glu Tyr Leu Gly
 350 355 360
 TTC GTC ATG AAC CGC CTG CTG TTT GTT GGT TCC CTG TAC CTG GCT GTC
 Phe Val Met Asn Arg Leu Leu Phe Val Gly Ser Leu Tyr Leu Ala Val
 365 370 375
 ATT GCT GTG CTG CCA AAC ATT ATG CTG GAT CTA GGT GTT GAC GCC GGT
 Ile Ala Val Leu Pro Asn Ile Met Leu Asp Leu Gly Val Asp Ala Gly
 380 385 390 400
 TCG GCC GGA GCA ACT CCA TTC GGC GGA ACC GCA ATC TTG ATT CTT GTA
 Ser Ala Gly Ala Thr Pro Phe Gly Gly Thr Ala Ile Leu Ile Leu Val
 405 410 415
 TCT GTT GCA CTG ACC ACA GTG AAG CAG ATT GAG AGC CAG CTC CTG CAA
 Ser Val Ala Leu Thr Thr Val Lys Gln Ile Glu Ser Gln Leu Leu Gln
 420 425 430
 AGC AAC TAC GAA GGA CTT CTA AAA TAA
 Ser Asn Tyr Glu Gly Leu Leu Lys ***
 435 440

【図面の簡単な説明】

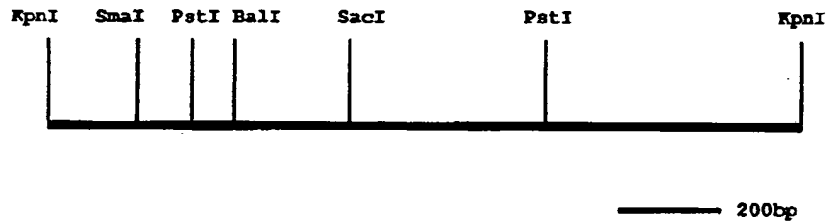
【図1】本発明のsecY遺伝子DNAを含むDNA断片の制限酵素による切断点地図。

【図2】大きさが約1.5kbの本発明のsecY遺伝

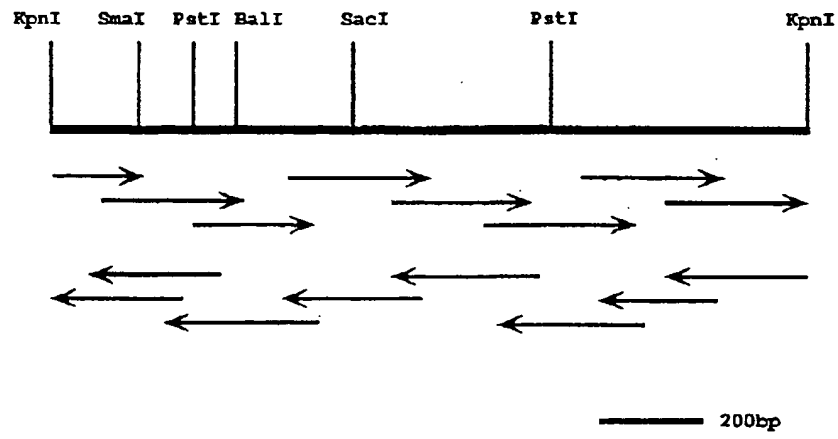
子DNAを含むDNA断片の塩基配列決定のための戦略図。

【図3】本発明のプラスミドpCRY30-secYの制限酵素の切断点地図。

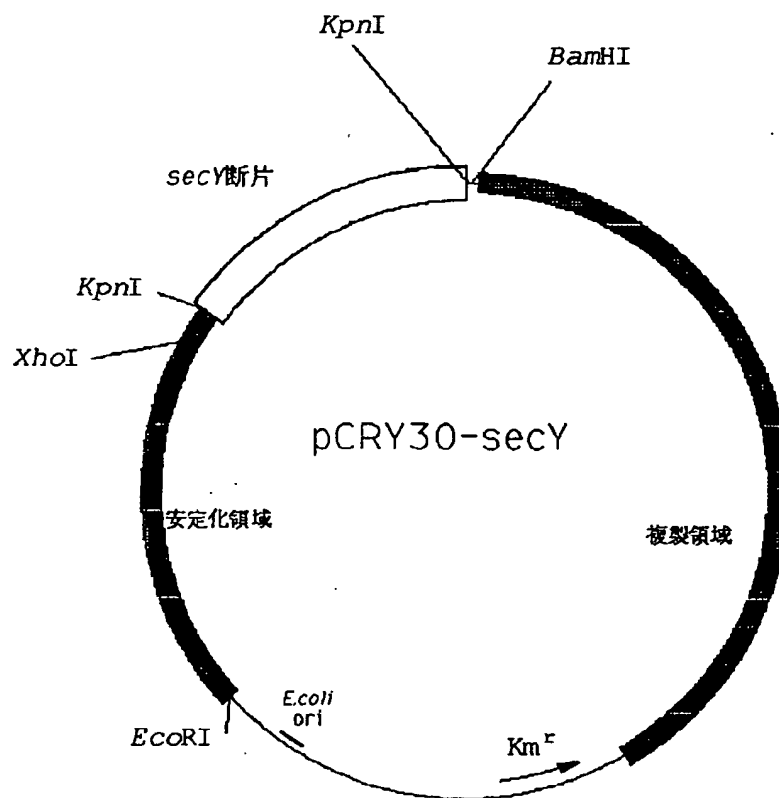
【図1】



【圖2】



【圖3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵

// C 1 2 P 21/02

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:13)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 8214-4B

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-261766

(43)公開日 平成6年(1994)9月20日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/54	Z N A			
C 1 2 P 13/08		A 2121-4B		
// (C 1 2 N 15/54				
C 1 2 R 1:13)				
	9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A	
	審査請求	未請求	請求項の数 8	O L (全 28 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平5-55451	(71)出願人	000006057 三菱油化株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22)出願日	平成5年(1993)3月16日	(72)発明者	佐藤 幸江 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内
		(72)発明者	谷野 信剛 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内
		(72)発明者	小林 幹 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内
		(74)代理人	弁理士 山本 隆也 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 フィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA及び

(57)【要約】 その利用

【構成】 A E C耐性を有しかつL-リジン生産性の増加したプレバクテリウム・フラバムM J 2 3 3から単離した、L-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA。

【効果】 このフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNAを導入したコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドで形質転換されたプレバクテリウム・フラバムM J 2 3 3株は、L-リジンの生成量が顕著に増加した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 プレビバクテリウム属細菌由来のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項2】 プレビバクテリウム属細菌がプレビバク

テリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ233である請求項1記載の遺伝子DNA。

【請求項3】 次のDNA塩基配列

```

GTGGCCCTGG TCGTACAGAA ATATGGCGGT TCCTGGCTTG AGAGTGGCGA ACGCATTAGA 60
AACGTGCTG AACGGATCGT TGCCACCAAG AAGGCTGGAA ATAATGTCGT GGTGTCTGTC 120
TCCGCAATGG GAGACACCAC GGATGAGCTT CTAGAACTTG CTGGGCGAGT GAATCCCGTT 180
CCGCCAGCTC GTGAAATGGA TATGCTCCTG ACTGCTGGTG AGCGTATTTT TAACGCTCTC 240
GTCGCCATGG CTATTGAGTC CCTGGGTGCA GAGGCTCAAT CTTTCACGGG TTCTCAGGCT 300
GGTGTGCTCA CCACCGAGCG TCACGGAAAC GCACGCATTG TTGATGTCAC TCCAGGTTCG 360
GTGGCTGAAG CACTCGATGA GGGCAAGATC TGCATTGTTG CTGTTTCCA GGGTGTCAAT 420
AAGGAAACCC GCGATGTCAC CACGTTGGGT CGCGGTGGTT CTGATACCAC TGCAGTTGCA 480
TTGGCAGCTG CTCTGAACGC TGATGTGTGT GAGATTTACT CAGATGTTGA CGGCGTGTAC 540
ACCGCTGACC CGGCATCGT TCCTAATGCT CAGAAGCTGG AAAAGCTCAG CTCGAAGAA 600
ATGCTGGAAC TTGCTGCTGT TGGCTCCAAG ATTTTGGTGC TACGCAGTGT TGAATACGCT 660
CGTGCATTCA ATGTGCCACT TCGGCTACGC TCGTCTTATA GCAATGATCC CGGCACCTTG 720
ATTGCCGGCT CTATGGAGGA TATTCCTGTG GAAGAAGCAG TCCTTACCGG TGTCGCAACC 780
GACAAGTCOG AAGCCAAAGT AACCGTTCGT GGTATTTCCG ATAAGCCAGG CGAGRYTGC 840
AAGGTTTTCC GTGCGTTGGC TGATGCAGAA ATCAACATTG ACATGGTTCT GCAGAACGTC 900
TYCTCTGTGG AAGACGGCAC CAYCGACATC ACGTTCACCT GCCCTCGCTC TGACGGACGC 960
CGTGCGATGG AGATCTTGAA GAAGCTTCAG GTTCAGGGCA ACTGGACCAA TGTGCTTTAC 1020
GACGACCAGG TCGGCAAAGT CTCCTCGTG GGTGCGGGCA TGAAGTCTCA CCCAGGTGTT 1080
ACCGCAGAGT TCATGGAAGC TCTGCGCGAT GTCAACGTGA ACATCGAATT GATTTCACCC 1140
TCTGAGATCC GCATTTCCGT GCTGATCCGT GAAGATGATC TGGATGCTGC TGCAOGTGCA 1200
CTGCATGAGC AGTTCCAGCT GGGCGGCGAA GACGAAGCCG TCGTTTATGC AGGCACCGGA 1260
CGC

```

(配列中、835番目のRはG又はAを示し、836番目、902番目および923番目のYはC又はTを示し、同時に、835番目のRがGであり、836番目、902番目および923番目のYがCであることはな

い。)で表されるL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項4】 次のアミノ酸配列

```

Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
1      5      10     15
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
20     25     30
Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
35     40     45
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
50     55     60
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
65     70     75     80
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
85     90     95
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
100    105    110
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
115    120    125
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
130    135    140
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala

```

145 150 155 160
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
 165 170 175
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
 180 185 190
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
 195 200 205
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
 210 215 220
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
 245 250 255
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
 260 265 270
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu AAA Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 275 280 285
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val YYY Ser Val Glu
 290 295 300
 Asp Gly Thr ZZZ Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
 305 310 315 320
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
 325 330 335
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
 340 345 350
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
 355 360 365
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
 370 375 380
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Arg Ala
 385 390 395 400
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
 405 410 415
 Ala Gly Thr Gly Arg
 420

(配列中、279番目のAAAはAla又はThr又はValを示し、301番目のYYYはSer又はPheを示し、308番目のZZZはThr又はIleを示し、同時に、279番目のAAAがAlaであり、301番目のYYYがSerであり、308番目のZZZがThrであることはない。)で表されるL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド。

【請求項6】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAと、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNAを保有する組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項6記載の組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌。

【請求項8】 グルコースを、請求項7記載のコリネ型細菌の培養菌体又は菌体処理物と接触させてL-リジンを生成せしめることを特徴とするL-リジンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、プレバクテリウム属細菌由来のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)をコードする遺伝子DNA、該遺伝子DNAを含む組換えプラスミド、該プラスミドで形質転換されたコリネ型細菌及び該コリネ型細菌を用いるL-リジンの製造法に関する。

【0002】 L-リジンは、必須アミノ酸として蛋白質中にその存在が知られ、医薬や食品添加物として用いられている。

【0003】

【従来の技術】従来、L-リジンの工業的製造法としては、グルタミン生産菌であるコリネ型細菌の各種栄養要求株、各種薬剤耐性株、各種薬剤感受性株を用いてL-リジンを製造する方法が知られている〔例えば、特公昭51-21078号公報、特公昭53-1833号公報、特公昭62-8692号公報等参照〕。また、組換え菌を用いた製造法も提案されている〔特開昭56-160997号公報、特開昭60-62994号公報、特開昭62-79788号公報等参照〕。しかしながら、従来提案されている方法によるL-リジンの製造法では、対糖収率が低く及び/又はL-リジンの蓄積に限界があり、新たな観点から、遺伝子工学的手法による菌株の改良等を含め、L-リジンをより効率的に生成させる方法の提供が強く求められている。

【0004】L-リジン生合成経路において、L-アスパラギン酸を初発とする第一ステップでアスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)によりL-アスパラギン酸にリン酸が付加される。該アスパルトキナーゼは、最終生成物であるL-リジンにより阻害を受ける、即ちフィードバックインヒビションを受け、培地中にある濃度以上L-リジンを蓄積させることができない。このことが、微生物を用いるL-リジンの製造上の問題となっていた。

【0005】一方、アスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)をコードする遺伝子としては、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)由来の遺伝子〔*Journal of Biological Chemistry*, 256, 10228~10230, 1981参照〕がよく研究されている。また、グラム陽性細菌由来のアスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)としては、バチルス・サチルス(*Bacillus subtilis*)、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)等が知られている〔*Journal of Biological Chemistry*, 262, 8787-8798, 1987; *Molecular Microbiology*, 5, 1197-1204, 1991参照〕。しかしながら、プレバクテリウム属由来のアスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)をコードする遺伝子については従来の報告例は見当たらない。

【0006】本発明者等は、先にプレバクテリウム・フラバム(*Brevibacterium flavum*) MJ233株染色体より、アスパルトキナーゼ遺伝子を単離し、該遺伝子を適当なベクタープラスミドに導入して、コリネ型細菌を形質転換し、該形質転換されたコリネ型細菌を用いると、効率的にL-リジンを製造しうることを見出し提案した(特願平4-24658号明細書参照)。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、プレバクテリウム属細菌由来のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)をコードする遺伝子DNAを単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該コリネ型細菌を用いて、新たな観点からさらに効率的にL-リジンを製造することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、S-(2-アミノエチル)-L-システイン(以下これを「AEC」と略称することがある)耐性を有するプレバクテリウム属細菌染色体より、L-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子DNAが単離可能であり、該遺伝子DNAを適当なベクタープラスミドに導入して、コリネ型細菌を形質転換し、該形質転換されたコリネ型細菌を用いると、さらに効率的にL-リジンを製造し得ることを見出し本発明を完成するに至った。

【0009】かくして本発明によれば、

- (1) プレバクテリウム属細菌由来のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA;
- (2) 後記配列表の配列番号6で示されるDNA塩基配列で表されるL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA;
- (3) 後記配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列で表されるL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA;
- (4) 該遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド;
- (5) 該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌;及び
- (6) 該形質転換されたコリネ型細菌を用い、グルコースを原料としてL-リジンを製造する方法が提供される。

【0010】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本発明の「L-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA」とは、AECを含有するプレートに生育可能なコリネ型細菌のうち、リジンの生育量が増加した株の染色体より抽出したアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA、すなわちL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)をコードする遺伝子DNAを意味するものである。

【0011】本発明のL-リジンによるフィードバックインヒビションが解除されたアスパルトキナーゼをコー

ドする遺伝子を含むDNA断片（以下、これを「A断片」と略称することがある）は、その塩基配列が決定された後においては合成することも可能であるが、通常はAEC耐性を有するアスパルトキナーゼ生産性微生物からクローニングされる場合が多く、その供給源となる微生物としては、AEC耐性を有するプレバクテリウム属細菌、殊にAEC耐性を有するプレバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ 233 (FERM BP-1497) およびその由来株が有利に使用される。

【0012】すなわち、A断片の好適な供給源微生物としてはアスパルトキナーゼ生産性微生物を変異処理し、AEC耐性を有しかつL-リジンの生産性の増加した微生物が使用される。変異処理を行なう微生物としては、上記したプレバクテリウム属細菌、殊にプレバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ 233 (FERM BP-1497) およびその由来株が有利に使用される。

【0013】これらの微生物を変異処理してA断片を調製するための基本的操作の一例を述べれば次のとおりである：まず、プレバクテリウム・フラバム MJ 233 にN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン処理により変異を誘起せしめた後、この菌懸濁液をAEC 10 g/l 含有する平板培地〔尿素0.2%、硫酸0.7%、KH₂PO₄ 0.05%、K₂HPO₄ 0.05%、MgSO₄・7H₂O 0.05%、FeSO₄・7H₂O 6 mg/l、MnSO₄・4~6H₂O 6 mg/l、ローピオチン200 μg/l、チアミン塩酸塩100 μg/l、寒天20 g/l、グルコース2%（滅菌後添加）〕に塗抹し、し、30℃にて3日間培養し、生じたコロニーを分離することにより、AECに耐性を有する変異株プレバクテリウム・フラバム MJ 233を得ることができる。

【0014】上記のようにして得られた変異株を好気的に培養して、培地中に生成蓄積するL-リジンの含量が親株より増加しているものをさらに選抜することにより、AEC耐性を有しかつL-リジン生産性の増加したプレバクテリウム・フラバム MJ 233を取得することができる。かくして得られるA断片の供給源となる微生物の好適具体例として以下の菌株を挙げることができる。

【0015】プレバクテリウム・フラバム MJ 233-Leu-AEC-Lys 163 (FERM P-13512)、プレバクテリウム・フラバム MJ 233-AEC-Lys 84 (FERM P-13511)、プレバクテリウム・フラバム MJ 233-AEC-Lys 242 (FERM P-13513)、プレバクテリウム・フラバム MJ 233-AEC-Lys 40 (FERM P-16510)。

【0016】これら変異株の菌学的性質は、AEC耐性

およびL-リジン生産性増加を除いては、親株であるプレバクテリウム・フラバム MJ 233と同様である

（菌学的性質については、特開昭51-130592号公報参照）。次に、上記したAEC耐性を有し、かつL-リジン生産性の増加したプレバクテリウム・フラバム MJ 233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばEcoRIを用いて染色体DNAを完全に分解する。

【0017】得られるDNA断片をクローニングベクター、例えばpHSG399（宝酒造製）に挿入し、このベクターを用いて、アスパルトキナーゼ遺伝子が欠損した大腸菌（エシェリヒア・コリ）変異株CGSC5074〔エシェリヒア・コリ ジエネテック・ストック センター (*Escherichia coli* Genetic Stock Center)、デパートメント・オブ・バイオロジー、エール・ユニバーシティ (Department of Biology, Yale University) ; P. O. Box 6666 New Haven, CT 06511-744, U. S. A. 保存菌株〕を形質転換し、AECを含有する選択培地に塗抹することにより、形質転換株を取得する。

【0018】得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたAEC耐性を有しかつL-リジン生産性の増加したプレバクテリウム・フラバム MJ 233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。かくして得られるA断片をさらに適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入し、このベクタープラスミドを、通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法、電気パルス法等による形質転換により、これを前記アスパルトキナーゼが欠損した大腸菌変異株に導入し、AECを含有する選択培地に塗抹する。

【0019】得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたAEC耐性を有しかつL-リジン生産性の増加したプレバクテリウム・フラバム MJ 233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。このようにして得られるA断片の一つは、上記AEC耐性を有しかつL-リジン生産性の増加したプレバクテリウム・フラバム MJ 233株の染色体DNAを制限酵素EcoRIの完全分解により切り出し、さらにそれを制限酵素NruIで切断することによって得られる大きさが約1.7 kbのDNA断片を挙げることができる。

【0020】この約1.7 kbのL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表1に、制限酵素による切断点地図を図1にそ

れぞれ示す。

【0021】

【表1】

表1		
制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (k b)
Pvu II	3	0. 1、0. 2、0. 7、0. 7
Dra I	1	0. 2、1. 5
Hinc II	2	0. 3、0. 6、0. 7
Hind III	1	0. 4、1. 2
Bgl II	2	0. 5、0. 6、0. 6
Pst I	2	0. 4、0. 6、0. 7
Nco I	1	0. 5、1. 2
Xba I	1	0. 4、1. 3

【0022】なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0023】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダファージ (λ phage) のDNAを制限酵素Hind IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ (ϕ x174 phage) のDNAを制限酵素Hae IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1k b以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0. 1k bから1k b未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0024】一方、上記のAEC耐性を有しかつLーリジン生産性の増加したプレバクテリウム・フラバムMJ233の染色体DNAを制限酵素Nru IおよびEcoRIによって切断することにより得られる大きさが約1. 7k bのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119 (宝酒造製) を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideox ychain termination法、Sanger, F. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, p5463, 1977) により決定することができる。このようにして決定した上記約1. 7k bのDNA断片の塩基配列のオープンリーディングフレームの存在から決定したLーリジンによる

フィードバックインヒビションが解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子は、後記配列表の配列番号2~5に示す配列を有するものであり、421個のアミノ酸をコードする1263の塩基対から構成されている。

【0025】なお、後記配列表の配列番号1に、比較対照としてAECを含有しない選択培地を用いた他は同様の方法で単離・配列を決定したプレバクテリウム・フラバムMJ233染色体由来のアスパルトキナーゼ遺伝子 (以下これを「野生型のアスパルトキナーゼ遺伝子」と言うことがある。) DNAの配列を示す。また、配列番号2に前記MJ233-Leu-AEC-Lys163株より得られた配列、配列番号3にMJ233-AEC-Lys84株より得られた配列、配列番号4にMJ233-AEC-Lys242株より得られた配列、配列番号5にMJ233-AEC-Lys40株より得られた配列をそれぞれ示す。

【0026】後記配列表の配列番号1~5に示される配列から明らかとなり、Lーリジンによりフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子DNAは、野生型のアスパルトキナーゼ遺伝子DNAと比較して、835番目、836番目、902番目、923番目の塩基がそれぞれGからA、CからT、CからTに変異することによって、279番目、279番目、301番目、308番目のアミノ酸がそれぞれAlaからThr、AlaからVal、SerからPhe、ThrからIleに変化したものである。

【0027】また、逆に、この配列をもとにして、サイトダイレクトミュータジェネシス (Site-directed mutagenesis法、Kramer, W. et. al. Nucl. Acids Res., 12, p9441, 1984) を用いて人為的に変異を導入することによっても、AEC耐性を付与する変異型アスパルトキナーゼ遺伝子を得ることができる。

【0028】これらの結果から、本発明のLーリジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子DNAは、後記配列表の配列番号6に示される塩基配列又は配列番号7に示されるアミノ配

列で表されるDNAであることが判明した。上記の塩基配列を包含する本発明のＬーリジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のAEC耐性を有するプレバクテリウム属細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製System-1 Plusを用いて合成されたものであってもよい。

【0029】また、前記の如くAEC耐性を有するプレバクテリウム・フラバムMJ233変異株の染色体DNAから取得される本発明のDNA断片は、Ｌーリジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0030】本発明のＬーリジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）は、適当なプラスミド、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少くとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でアスパルトキナーゼの高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0031】また、本発明のＬーリジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を発現させるためのプロモーターはコリネ型細菌が保有する該遺伝子自身のプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、アスパルトキナーゼ遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であればいかなるプロモーターであってもよい。

【0032】本発明のA断片を導入することができる、コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を少くとも含むプラスミドベクターとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2及びpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ184；特開昭57-134500号に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG

11等を挙げることができる。

【0033】中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とをもつものが好ましく、例えば、プラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX等が好適に使用される。

【0034】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、プレバクテリウム・スタチオニス (*Brevibacterium stationis*) IFO12144 (FERM BP-2515) からプラスミドpBY503（このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照）DNAを抽出し、制限酵素XhoIで大きさが約4.0kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片（以下これを「複製機能領域」と言うことがある。）を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片（以下これを「安定化機能領域」と言うことがある。）を切り出す。これらの両断片をプラスミドpHSG298（宝酒造製）のEcoRI、KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0035】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えばプラスミドベクター中に1個所だけ存在する制限酵素部位を、該制限酵素で開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下にDNAリガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。

【0036】プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIで開裂させ、そこに前記アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。このようにして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約1.7kbのA断片を導入した組換えプラスミドは、Ｌーリジンの製造に好適に用いることができる組換えプラスミドの一つであり、本発明者らはこれをプラスミドpCRY30-AK835と命名した。プラスミドpCRY30-AK835の作成方法の詳細については、後記実施例5で説明する。

【0037】このようにして造成されるＬーリジンによるフィードバックインヒビションが解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子を含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを、宿主微生物に導入して該微生物の培養物を用いてＬーリジンを安定に効率より生産することが

可能となる。本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ233 (FERM BP-1497)、プレビバクテリウム・フラバムMJ233-A B-41 (FERM BP-1498)、プレビバクテリウム・フラバムMJ233-ABT-11 (FERM BP-1500)、プレビバクテリウム・フラバムMJ233-ABD-21 (FERM BP-1499) 等が挙げられる。

【0038】なお、上記のFERM BP-1498の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてD- α -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール酸化性微生物である(特公昭59-28398号公報第3~4欄参照)。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- α -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である(特開昭62-51998号公報参照)。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERMBP-1497の菌株を親株としたD- α -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である(特開昭61-177993号公報参照)。

【0039】これらの微生物の他に、プレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746; プレビバクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020; プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869; コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0040】なお、宿主としてプレビバクテリウム・フラバムMJ233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502(特開昭63-36787号公報参照)のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である(Bact. Rev. 36 p. 361~405(1972)参照)。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0041】宿主プレビバクテリウム・フラバムMJ233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ(濃度: 0.2~50 μ g/ml)もしくはエチジウムブロミド(濃度: 0.2~50 μ g/ml)等を含む培地に、1ml当り約10細胞になるように植菌し、生

育を不完全に阻害しながら約24時間約35℃で培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約35℃で約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミドpBY502が除去されたプレビバクテリウム・フラバムMJ233由来菌株が得られる。

【0042】このようにして得られるプレビバクテリウム・フラバムMJ233由来菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、エシェリヒア・コリ及びエルビニア・カロトボラについて知られているように[Calvin, N. M. and Hanawalt, P. C., Journal of Bacteriology, 170, 2796(1988); Ito, K., Nishida, T. and Izaki, K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293(1988)参照]、DNA受容菌へのパルス波通電[Sato, Y. et al., Journal of Industrial Microbiology, 5, 159(1990)参照]によりプラスミドを導入することが可能である。

【0043】上記の方法で形質転換して得られるL-リジンによるフィードバックインヒビションが解除されたアスパルトキナーゼ産性を有するコリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ233由来株の培養方法を以下に述べる。培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、蔗糖等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えば、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

【0044】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気条件下に、約20~約40℃、好ましくは約25℃~約35℃の温度で行うことができる。培養途中のpHは5~10、好ましくは7~8付近とすることができ、培養中のpH調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは1~5容量%、更に好ましくは2~3容量%である。また、培養期間は通常1~7日間とすることができ、最適期間は3日間である。

【0045】このようにして得られる培養物から各々菌体を集めて、水又は適当な緩衝液で洗浄し、L-リジン生成反応に使用することができる。L-リジン生成反応においては、これらの菌体をそのまま用いることができ、あるいは超音波処理等を加えた菌体破砕物、さらに

それから分離回収した粗酵素又は精製酵素として、あるいはそれらを適当な担体に固定化して用いることができる。以上に述べた如き菌体の破砕物や粗または精製酵素、固定化物等を本明細書ではまとめて「菌体処理物」という。

【0046】しかして本発明に従えば、グルコースを、上記培養菌体又は菌体処理物と接触させて、L-リジンを生成せしめることからなるL-リジンの製造法が提供される。グルコースと上記培養菌体又は菌体処理物との接触は、通常の酵素反応と同様に、水性媒体中において、好ましくは約20～約40℃、特に約25～約35℃において行なうことができる。

【0047】生成するL-リジンは例えば、高速液体クロマトグラフィー等の手段により反応液から分離回収することができる。

【0048】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。

参考例1

プレバクテリウム・フラバムMJ 233由来のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)のクローニング

【0049】(A) プレバクテリウム・フラバムMJ 233の全DNAの抽出

半合成培地A培地〔組成：尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7g、 K_2HPO_4 0.5g、 KH_2PO_4 0.5g、 MgSO_4 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン200 μg 、塩酸チアミン200 μg 、グルコース20g、蒸留水1リットル〕1リットルに、プレバクテリウム・フラバムMJ 233 (FERM BP-1497) を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM NaCl-20mMトリス緩衝液(pH8.0)-1mM EDTA-2Na溶液15mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して容菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離(5,000 \times g、20分間、10～12℃)し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mMトリス緩衝液(pH7.5)-1mM EDTA-2Na溶液5mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0050】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たプレバクテリウム・フラバムMJ 233の全DNA溶液の90 μl を制限酵素EcoRI 50unitsを用い、37℃で1時間反応させ完全分解した。このEcoRI分解DNAにクローニングベクターpHSG399(宝酒造より市販)を制限酵素EcoRIで切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl_2 及びT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

【0051】(C) アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むプラスミドの選択

上記遺伝子の選抜に用いたアスパルトキナーゼ欠損大腸菌変異株は、エシェリヒア・コリCGSC5074(thr A1101, lys C1001, met L1000)である〔()内はアスパルトキナーゼ遺伝子型(Genotype)を示す〕。

【0052】上記(B)項で得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970)により前記エシェリヒア・コリCGSC5074株を形質転換し、クロラムフェニコール50mgを含む選択培地〔 K_2HPO_4 7g、 KH_2PO_4 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解〕に塗抹した。

【0053】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpHSG399の長さ2.2kbのDNA断片に加え、長さ約3.8kbの挿入DNA断片が認められた。本プラスミドをpHSG399-AKと命名した。

【0054】(D) アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A)断片のサブクローニング

上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-AKに含まれるDNA挿入断片を、必要な部分だけに小型化するために、プラスミドpUC119(宝酒造より市販)へアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0055】上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-AKを制限酵素EcoRI、NruIで切断したものと、プラスミドpUC119を制限酵素EcoRI、SmaIで切断したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl_2 及びT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ、結合

させた。

【0056】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) により前記エシェリヒア・コリCGSC5074株を形質転換し、アンピシリン50mgを含む選択培地 (K_2HPO_4 7g, KH_2PO_4 2g, $(NH_4)_2SO_4$ 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g, グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解) に塗抹した。

【0057】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を

用いて調べたところ、プラスミドpUC119の長さ3.2kbのDNA断片に加え、長さ約1.7kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約1.7kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表1に示したものと同様であり、このDNA断片の制限酵素切断点地図も図1に示したものと同様であった。

【0058】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表2に示す。

【0059】

【表2】

表2			プラスミドpUC119-AK
制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)	
BamH I	1	4.9	
Bgl II	2	4.2, 0.6	
Hind III	2	3.6, 1.2	

【0060】上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpUC119-AKと命名した。以上によりアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含む大きさが約1.7kbのDNA断片 (NruI-EcoRI断片) を得ることができた。

【0061】参考例2

アスパルトキナーゼをコードする遺伝子の塩基配列の決定

実施例1の(D)項で得られたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含む長さが約1.7kbのDNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119 (宝酒造製) を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination法) (Sanger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977) により図2に示した戦略図に従って決定した。

【0062】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、アスパルトキナーゼをコードする遺伝子は、後記配列表の配列番号1に示す塩基配列を有する421個のアミノ酸をコードする1263の塩基対より構成されていることが判明した。

【0063】参考例3

コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクターpCRY30の作成

(A) プラスミドpBY503の調製

プラスミドpBY503は、プレバクテリウム・スタチオニスIFO12144 (FERM BP-2515) から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載のようにして調製した。

【0064】半合成培地A培地 [尿素2g, $(NH_4)_2SO_4$ 7g, K_2HPO_4 0.5g, KH_2PO_4

0.5g, $MgSO_4$ 0.5g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 6mg, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 6mg, 酵母エキス2.5g, カザミノ酸5g, ピチオン200μg, 塩酸チアミン200μg, グルコース20g及び蒸留水1リットル] 1リットルに、プレバクテリウム・スタチオニスIFO12144を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む緩衝液 [25mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン, 10mMのEDTA, 50mMグルコース] 20mlに懸濁し、37℃で1時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS液 [0.2N NaOH, 1% (W/V) SDS] 40mlを添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液 [5M酢酸カリウム溶液60ml, 酢酸11.5ml, 蒸留水28.5mlの混合液] 30mlを添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0065】溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、上澄液を得た。これに等量のフェノール-クロロホルム液 (フェノール:クロロホルム=1:1混和液) を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で5分間、15,000×gの遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に2倍量のエタノールを加え、-20℃で1時間静置後、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、沈澱を回収した。

【0066】沈澱を減圧乾燥後、TE緩衝液 [トリス10mM, EDTA 1mM; HClにてpH8.0に調整] 2mlに溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液 [5倍濃度のTE緩衝液100mlに塩化セシウム170gを溶解させた液] 15mlと10mg/mlエチジウムブロマイド溶液1mlを加えて、密度を1.392g/mlに合わせた。この溶液を12℃で42時間、11

6, 000×gの遠心分離を行った。

【0067】プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見いだされる。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後TE緩衝液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に3M酢酸ナトリウム溶液を最終濃度30mMに添加した後、2倍量エタノールを加え、-20℃1時間静置した。この溶液を15, 000×gの遠心分離にかけてDNAを沈降させ、プラスミドpBY503を50μg得た。

【0068】

(B) プラスミドベクターpCRY30の作成

プラスミドpHSG298 (宝酒造製) 0.5μgに制限酵素SalI (5units) を37℃1時間反応させ、プラスミドDNAを完全に分解した。前記(A)項で調製したプラスミドpBY503の2μgに制限酵素XhoI (1unit) を37℃で30分間反応させ、プラスミドDNAを部分分解した。

【0069】両者のプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために65℃で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50mMトリス緩衝液pH7.6、10mM MgCl₂、10mMジチオスレイトール、1mM ATP及びT4 DNAリガーゼ1unitになるように各成分を強化し、16℃で15時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリJM109コンピテントセル (宝酒造製) を形質転換した。

【0070】形質転換株は30μg/ml (最終濃度) のカナマイシン、100μg/ml (最終濃度) のIPTG (イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド) 100μg/ml (最終濃度) のX-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルーβ-D-ガラクトピラノシド) を含むL培地 (トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g及び蒸留水1リットル、pH7.2) で37℃にて24時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリーSDS法 [T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, "Molecular cloning" (1982) p90~91参照] により抽出した。

【0071】その結果、プラスミドpHSG298のSalI部位にプラスミドpBY503由来の約4.0kbの断片が挿入されたプラスミドpHSG298-oriが得られた。次に同様の方法を用い、前記(A)項で得られたプラスミドpBY503DNAを制限酵素KpnI及びEcoRIにて処理して得られる約2.1kb

のDNA断片を上記プラスミドpHSG298-oriのKpnI及びEcoRI部位にクローニングし、プラスミドベクターpCRY30を調製した。

【0072】参考例4

プラスミドpCRY30-AKの作成及びコリネ型細菌への導入

参考例1の(C)項で得られたプラスミドpHSG39-AK5μgを制限酵素EcoRIおよびNruIを各5units用い、37℃で1時間反応させ分解したものと、EcoRIリンカー (宝酒造より市販) 1μlを混合し、50mMトリス緩衝液 (pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂ およびT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。

【0073】このDNAを制限酵素EcoRI 3unitsを用い37℃で1時間反応させ分解したものと、参考例3の(B)項で得られたプラスミドpCRY30 1μgを制限酵素EcoRI 1unitを用い、37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス緩衝液 (pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂ およびT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシェリヒア・コリCGSG5074株を形質転換し、カナマイシン50μg/mlを含む選択培地 [K₂HPO₄ 7g、KH₂PO₄ 2g、(NH₄)₂SO₄ 1g、MgSO₄・7H₂O 0.1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解] に塗抹した。

【0074】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6kbのDNA断片に加え、大きさ約1.7kbの挿入DNA断片が認められた。上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。

【0075】形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。プレバクテリウム・フラバムMJ233 (FERM BP-1497) プラスミドpBY502除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlのバルス用溶液 (272mM sucrose、7mM KH₂PO₄、1mM MgCl₂; pH7.4) にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離して集め、5mlのバルス用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50μlとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーン

バルサー（バイオラド社製）を用いて、2500ボルト、25 μ FDに設定し、パルスを加後水中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15 μ g/ml（最終濃度）を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2～3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施

例3（A）項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表3に示す。

【0076】

【表3】

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamHI	1	10.4
KpnI	1	10.4
SacI	1	10.4
XhoI	1	10.4
EcoRI	2	1.7, 8.7
XbaI	2	3.4, 7.0
SphI	3	1.7, 2.1, 6.6
PstI	4	0.4, 1.7, 3.3, 5.0

【0077】上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-AKと命名した。なお、プラスミドpCRY30-AKにより形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ233-AKは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業技術研究所に、微工研菌寄第12658号（FERM P-12658）として寄託されている。

【0078】実施例1

プレバクテリウム・フラバムMJ233のAEC耐性変異株の取得

1) AEC耐性株の分離

培地（尿素0.4%、硫酸1.4%、KH₂PO₄0.05%、K₂HPO₄0.05%、MgSO₄・7H₂O0.05%、FeSO₄・7H₂O6mg/l、MnSO₄・4～6H₂O6mg/l、ビオチン200 μ g/l、チアミン塩酸塩100 μ g/l、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%）50mlを500ml容三角フラスコに分注、滅菌し、pH7に調節した後、プレバクテリウム・フラバムMJ233を植菌し、無菌的にグルコースを5g/lの濃度になるように加え、30℃にて2日間振盪培養を行なった。

【0079】菌体を回収し、TMバッファー（Tris24.2g/l、マレイン酸23.2g/lの液を25mlと0.2N NaOH15mlを混合し、100mlにメスアップする）5mlで1回洗浄を行なった。N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン300 μ g/mlを含む上記TMバッファーに菌を懸濁し、30℃で2時間インキュベートした。

【0080】この菌体処理液を上記培地（カザミノ酸、酵母エキスを除く）にて2回洗浄したのち、AEC10g/lを含有する平板培地〔尿素0.2%、硫酸0.7%、KH₂PO₄0.05%、K₂HPO₄0.05%、MgSO₄・7H₂O0.05%、FeSO₄・7H₂O6mg/l、MnSO₄・4～6H₂O6

mg/l、ロービオチン200 μ g/l、チアミン塩酸塩100 μ g/l、寒天20g/l、グルコース2%（滅菌後添加）〕に塗抹し、30℃にて3日間培養し、生じたコロニーを分離した。

【0081】次に生じたコロニーを100mlの上記培地を用いて培養し、集菌後2回洗浄し、L-リジンの定量を行なった。L-リジンの定量は、高速液体クロマトグラフィー（島津LC-5A）を用いて行なった。この結果、AEC耐性株中にL-リジンの生成量が、野生型に比べて著しく増大した株が存在し、これを次のとおり命名した。

【0082】プレバクテリウム・フラバムMJ233-Leu-AEC-Lys163（FERM P-13512）、プレバクテリウム・フラバムMJ233-AEC-Lys84（FERMP-13511）、プレバクテリウム・フラバムMJ233-AEC-Lys242（FERMP-13513）、プレバクテリウム・フラバムMJ233-AEC-Lys40（FERMP-13510）。

【0083】上記した各菌株は、茨城県つくば市東1丁目1番1号の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。これらの菌株を以下の実験に用いた。

【0084】

2) AEC耐性株のアスパルトキナーゼ活性の測定

培地（尿素0.4%、硫酸アンモニウム1.4%、KH₂PO₄0.05%、K₂HPO₄0.05%、MgSO₄・7H₂O0.05%、CaCl₂・2H₂O2ppm、FeSO₄・7H₂O2ppm、MnSO₄・4～6H₂O2ppm、ZnSO₄・7H₂O2ppm、NaCl2ppm、ビオチン200 μ g/l、チアミン・HCl100 μ g/l、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%）10mlを24 ϕ 試験管に分注、滅菌（滅菌後pH7.0）した後上記1)項で得たAEC耐性を有するプレバクテリウム・フラバ

ム (*Brevibacterium flavum*) を各々植菌し、無菌的にグルコースを5g/lの濃度になるように加え、30℃にて2日間振盪培養を行った。

【0085】次に、本培養培地(グルコース5%、硫酸アンモニウム2.3%、 KH_2PO_4 0.05%、 K_2HPO_4 0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20ppm、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ 20ppm、ビオチン200 $\mu\text{g/l}$ 、チアミン $\cdot\text{HCl}$ 100 $\mu\text{g/l}$ 、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.3%)の100mlを500ml容三角フラスコに分注、滅菌(120℃、20分間)後、前記前培養物の1mlを添加して温度33℃にて24時間培養を行った。

【0086】培養終了後、培養物100mlから遠心分離にて集菌後、脱塩蒸留水にて洗浄した菌体を100mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.8)で1回洗浄後、同緩衝液を2ml添加し、ガラスビーズ1gを加えた。超音波にて菌体を破砕した後、12,000rpm、40分間遠心し上清を得た。アスパルトキナーゼ活性を測定する反応液[アスパラギン酸カリウム(pH8)1050mM、ATP20mM、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 30mM、 $\text{Tris} \cdot \text{HCl}$ (pH8)100mM、ヒドロキシルアミン600mM]に調製した上清0.1mlを加え全体を1mlにしたのち、37℃で1時間反応させた。これに2.5mlの呈色液[5% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ と、12%TCAと3N HClを等量混合したもの]を添加し、遠心後上清の540nmの吸光度を測定した。

【0087】反応液にスレオニン(Thr)、リジン(Lys)をまったく無添加のときの値を100とし、これに対するThr、Lysをそれぞれ100mM、200mM添加したときの割合を、脱感作度と定義した。野生型の株のアスパルトキナーゼの脱感作度は0%であるのに対し、変異株MJ233-Leu-AEC-Lys163、MJ233-AEC-Lys84、MJ233-AEC-Lys242、MJ233-AEC-Lys40ではそれぞれ70%、50%、80%、40%であった。すなわちAEC耐性の変異株1、2、3、4、では、アスパルトキナーゼがLys、Thrに対するフィードバックインヒビションが解除されていることが確認された。

【0088】実施例2

フィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子の単離および同定

実施例1で得られた各菌株を同様の培地で培養し以下の方法で染色体DNAを回収した。

【0089】得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM NaCl-20mMトリス緩衝液(pH8.0)-1mM EDTA-2Na溶液15mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が

100 $\mu\text{g/ml}$ になるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して容菌した。この容菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離(5,000 $\times g$ 、20分間、10 \sim 12℃)し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mMトリス緩衝液(pH7.5)-1mM EDTA-2Na溶液5mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0090】次に、上記で各菌株から得られた染色体DNAを制限酵素EcoRI、NruI各10unitsで完全に分解し、プラスミドpUC119を制限酵素EcoRI、SmaI各2unitsで切断したものを各々混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl_2 及びT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し12℃で16時間反応させ結合させた。

【0091】得られた各プラスミド混液を用い、塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology 53, 159, 1970)により、前記アスパルトキナーゼ欠損大腸菌変異株、エシェリヒア・コリCGSC5074(thr A1101, lys C1001, met L1000)〔()内はアスパルトキナーゼ遺伝子型(genotype)を示す〕を各々形質転換し、アンピシリン50mgを含む選択培地[K_2HPO_4 7g、 KH_2PO_4 2g (N H_4) $_2\text{SO}_4$ 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、グルコース20g、寒天16g、1リットルにメスアップ)に各々塗抹した。生育してきた各コロニーをAEC5g/lを含む同選択培地に各々塗抹し、AEC耐性であることを確認した。

【0092】この各々の培地上的に生育株を常法により液体培養し、培養液より各プラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により各々切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpUC119の長さ3.2kbのDNA断片に加え、長さ約1.7kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約1.7kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは、各変異株から得られたものとも同種であり、前記表1に示したとおりであった。

【0093】また上記で得たMJ233-Leu-AEC-Lys163より得られた1.7kbのDNA断片が導入されたプラスミド(プラスミドpUC119-AK835)を各種制限酵素で切断して、切断断片の大き

さを測定した。その結果を下記の表4に示す。

【0094】

表4		
プラスミドpUC119-AK835		
制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamH I	1	4. 9
Bgl II	2	4. 2, 0. 6
Hind III	2	3. 6, 1. 2

【0095】なお、他変異株から得られた1. 7 kbのDNA断片が導入された各プラスミドの制限酵素認識部位数および切断断面片の大きさは表4に示したものと同様であった。

【0096】実施例3

フィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子の塩基配列の決定

実施例2で得られたフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子DNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119を用いるジスクレオチド酵素法 (dideoxycy chain termination法, Songer et. al., Proc. Natl. Acad. Res. USA., 74, 5463, 1977) により決定した。

【0097】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、フィードバックインヒビションが解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子は、後記配列表の配列番号2～5に示す塩基配列を有する421個のアミノ酸をコードする1263塩基対より構成されていることが判明した。その配列は、野生型のアスパルトキナーゼ配列 (配列番号1) と比べて、835番目のGがAに変異することにより279番目のアミノ酸がAlaからThrに変化したもの (配列番号2)、836番目のCがTに変異することにより279番目のアミノ酸がAlaからValに変化したもの (配列番号3)、902番目のCがTに変異することにより301番目のアミノ酸がSerからPheに変化したもの (配列番号4)、923番目のCがTに変化することにより308番目のアミノ酸がThrからIleに変化したもの (配列番号5) であることがわかった。

【0098】実施例4

サイトダイレクトミュータジェネシスによる人為的フィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子の作成

野生型アスパルトキナーゼ遺伝子がpUC119にクローニングされたプラスミドpUC119-AK (参考例1) を用いて下記の方法にて変異を導入した。

【0099】まず、pUC119-AKを含むエシェリヒア・コリJM109 (宝酒造製) にM13KO7ファージ (宝酒造製) を感染させて常法に従い1本鎖DNAを作製した。この1本鎖DNAと、pUC119を95℃、5分間加熱し急冷したものを混合し、アニーリング

【表4】

させることにより、野生型アスパルトキナーゼ遺伝子部分が1本鎖でペクター部分が2本鎖である分子を形成させた。

【0100】これに実施例3で見出した変異部分を中央に含む25merの1本鎖合成DNAを4種類作製しそれぞれ混合した。さらにDNAポリメラーゼによりギャップを修復したのち、それぞれ、実施例1で使用したアスパルトキナーゼ欠損大腸菌変異株、エシェリヒア・コリCGSC5074株に導入し、AEC10g/lを含む前記選択培地に塗抹した。

【0101】生じたコロニーよりそれぞれプラスミドを抽出し、実施例3と同様の方法で塩基配列を決定したところ、それぞれ配列番号2～5に示した配列と全く同様の配列を有していた。

【0102】実施例5

プラスミドpCRY30-AK835の作成及びコリネ型細菌への導入

実施例2で得られたプラスミドpUC119-AK835 5μgを制限酵素EcoRIおよびNruIを各5 units用い、37℃で1時間反応させ分解したものと、EcoRIリンカー (宝酒造より市販) 1μlを混合し、50mMトリス緩衝液 (pH7. 6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂ およびT4 DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。

【0103】このDNAを制限酵素EcoRI 3 unitsを用い37℃で1時間反応させ分解したものと、参考例3の (B) 項で得られたプラスミドpCRY30 1μgを制限酵素EcoRI 1 unitを用い、37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス緩衝液 (pH7. 6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂ およびT4 DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシェリヒア・コリCGSC5074株を形質転換し、カナマイシン50μg/mlを含む選択培地 [K₂HPO₄ 7g、KH₂PO₄ 2g、(NH₄)₂SO₄ 1g、MgSO₄・7H₂O 0. 1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解] に塗抹した。

【0104】この培地上の生育株を常法により液体培養

し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6kbのDNA断片に加え、大きさ1.7kbの挿入DNA断片が認められた。上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。

【0105】形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。プレバクテリウム・フラバムMJ233 (FERM BP-1497) プラスミドpBY502 除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlのパルス用溶液(272mM Sucrose、7mM KH_2PO_4 、1mM MgCl_2 ; pH7.4)にて洗浄した。さらに菌体を遠心分

離して集め、5mlのパルス用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50μlとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーンパルサー(パイオラド社製)を用いて、2500ボルト、25μFDに設定し、パルスを印加後氷中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15μg/ml(最終濃度)を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例3(A)項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表5に示す。

【0106】

【表5】

表5 プラスミドpCRY30-AK835		
制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(kb)
BamHI	1	10.4
KpnI	1	10.4
SacI	1	10.4
XhoI	1	10.4
EcoRI	2	1.7、8.7
XbaI	2	3.4、7.0
SphI	3	1.7、2.1、6.6
PstI	4	0.4、1.7、3.3、5.0

【0107】上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-AK835と命名した。なお、プラスミドpCRY30-AK835により形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ233-AK835は、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業技術研究所に、平成5年3月4日付で受託番号:FERM P-13508として寄託されている。

【0108】実施例6

L-リジンの生産

培地(尿素0.4%、硫酸アンモニウム1.4%、 KH_2PO_4 0.05%、 K_2HPO_4 0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2ppm、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2ppm、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ 2ppm、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2ppm、NaCl 2ppm、ビオチン200μg/l、チアミン・HCl 100μg/l、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%)10mlを500ml容三角フラスコに分注、滅菌(滅菌後pH7.0)した後プレバクテリウム・フラバム(*Brevibacterium flavum*) MJ233-AK835 (FERM P-13508号)を植菌し、無菌的にグルコースを5g/lの濃度になるように加え、30℃にて2日間振盪培養を行った。

【0109】次に、本培養培地(グルコース5%、硫酸

アンモニウム2.3%、 KH_2PO_4 0.05%、 K_2HPO_4 0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20ppm、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ 20ppm、ビオチン200μg/l、チアミン・HCl 100μg/l、カザミノ酸0.3%、酵母エキス0.3%)の1000mlを2リットル容通気攪拌槽に仕込み、滅菌(120℃、20分間)後、前記前培養物の20mlを添加して、回転数1000rpm、通気量1vvm、温度33℃、pH7.6にて24時間培養を行った。

【0110】培養終了後、培養物500mlから遠心分離にて集菌後、脱塩蒸留水にて2度洗浄した菌体を反応液[(NH_4)₂SO₄ 2g/l; KH_2PO_4 0.5g/l; KH_2PO_4 0.5g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20ppm; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ 20ppm; チアミン塩酸塩100μg/l; pH7.6]の1000mlに懸濁後、該懸濁液を2リットル容通気攪拌槽に仕込み、グルコース9gを添加して、回転数300rpm、通気量0.1vvm、温度33℃、pH7.6にて24時間反応を行った。

【0111】反応終了後、遠心分離(4000rpm、15分間、4℃)にて除菌した上清液中のL-リジンを定量した。この反応終了後の培養液500mlを、強酸性陽イオン交換樹脂(H⁺型)のカラムに通してL-リ

ジンを吸着させ、水洗後、0.5Nアンモニア水で溶出させた後、L-リジン画分を濃縮し、冷エタノールでL-リジンの結晶を析出させた。

【0112】また、比較例として、同様の条件にて、プレバクテリウム・フラバムMJ233 (FERM B P-1.497) およびプレバクテリウム・フラバムM

J233-AK (FERM P-12658) を培養し、同様の条件にて反応させた後にL-リジンを定量し、同様の条件にてL-リジンの結晶を得た。それらの結果を表6に示す。

【0113】

【表6】

表6

菌株	プラスミド	L-リジン生成量	結晶析出量
MJ233-AK835	pCRY30-AK835	8.0 g/l	2000 mg
MJ233-AK	pCRY30-AK	1.5 g/l	400 mg
MJ233	---	0.6 g/l	120 mg

【0114】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 1263

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: プレバクテリウム フラバム

株名: MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号: peptide

存在位置: 1-1263

特徴を決定した方法: P

【0115】

配列

```

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG
Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
1          5          10          15
GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
20          25          30
GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT
Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
35          40          45
GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
50          55          60
GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
65          70          75          80
GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
85          90          95
GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
100         105         110
ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
115         120         125
AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
130         135         140
GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
145         150         155         160

```

TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
 165 170 175
 GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
 180 185 190
 CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
 195 200 205
 TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
 210 215 220
 GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
 245 250 255
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
 260 265 270
 TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 275 280 285
 GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
 290 295 300
 GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
 305 310 315 320
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
 325 330 335
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
 340 345 350
 GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
 355 360 365
 CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
 370 375 380
 ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala
 385 390 395 400
 CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
 405 410 415
 GCA GGC ACC GGA CGC
 Ala Gly Thr Gly Arg
 420

【0116】配列番号:2

配列の長さ:1263

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:Genomic DNA

起源

生物名:プレビバクテリウム フラバム

株名: MJ233-Leu-AEC-Lys163

配列の特徴

特徴を表す記号: peptide

存在位置: 1-1263

特徴を決定した方法: E

【0117】

配列

```
GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG
Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
1 5 10 15
GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
20 25 30
GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT
Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
35 40 45
GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
50 55 60
GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
65 70 75 80
GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
85 90 95
GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
100 105 110
ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
115 120 125
AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
130 135 140
GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
145 150 155 160
TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
165 170 175
GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
180 185 190
CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
195 200 205
TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
210 215 220
```

GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
 245 250 255
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
 TCC GAT AAG CCA GGC GAG ACT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Thr Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 275 280 285
 GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
 290 295 300
 GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
 305 310 315 320
 CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
 325 330 335
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
 340 345 350
 GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
 355 360 365
 CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
 370 375 380
 ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Arg Ala
 385 390 395 400
 CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
 405 410 415
 GCA GGC ACC GGA CGC
 Ala Gly Thr Gly Arg
 420

【0118】配列番号: 3

配列の長さ: 1263

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: プレビパクテリウム フラバム

株名: MJ233-AEC-Lys84

配列の特徴

特徴を表す記号: peptide

存在位置: 1-1263

特徴を決定した方法: E

【0119】

配列

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG
 Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
 1 5 10 15
 GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT

Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
 20 25 30
 GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT
 Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
 35 40 45
 GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT
 Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
 50 55 60
 GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
 65 70 75 80
 GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG
 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
 85 90 95
 GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
 100 105 110
 ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
 115 120 125
 AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
 130 135 140
 GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
 145 150 155 160
 TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
 165 170 175
 GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CGC CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
 180 185 190
 CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
 195 200 205
 TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
 210 215 220
 GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
 245 250 255
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
 260 265 270
 TCC GAT AAG CCA GGC GAG GTT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Val Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 275 280 285

GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
 290 295 300
 GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
 305 310 315 320
 CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
 325 330 335
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
 340 345 350
 GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
 355 360 365
 CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
 370 375 380
 ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala
 385 390 395 400
 CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
 405 410 415
 GCA GGC ACC GGA CGC
 Ala Gly Thr Gly Arg
 420

【0120】配列番号：4

配列の長さ：1263

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレビバクテリウム フラバム

株名：MJ233-AEC-Lys242

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-1263

特徴を決定した方法：E

【0121】

配列

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG
 Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
 1 5 10 15
 GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT
 Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
 20 25 30
 GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT
 Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
 35 40 45
 GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT
 Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
 50 55 60
 GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
 65 70 75 80

GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG
 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
 85 90 95
 GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
 100 105 110
 ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
 115 120 125
 AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
 130 135 140
 GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
 145 150 155 160
 TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
 165 170 175
 GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
 180 185 190
 CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
 195 200 205
 TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
 210 215 220
 GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
 245 250 255
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
 260 265 270
 TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 275 280 285
 GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TTC TCT GTG GAA
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Phe Ser Val Glu
 290 295 300
 GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
 305 310 315 320
 CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
 325 330 335
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala

340 345 350
 GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
 355 360 365
 CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
 370 375 380
 ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala
 385 390 395 400
 CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
 405 410 415
 GCA GGC ACC GGA CGC
 Ala Gly Thr Gly Arg
 420

【0122】配列番号：5

配列の長さ：1263

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレビバクテリウム フラバム

株名：MJ233-AEC-Lys40

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-1263

特徴を決定した方法：E

【0123】

配列

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG
 Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
 1 5 10 15
 GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT
 Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
 20 25 30
 GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT
 Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
 35 40 45
 GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT
 Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
 50 55 60
 GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
 65 70 75 80
 GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG
 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
 85 90 95
 GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GCA AAC GCA CGC
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
 100 105 110
 ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
 115 120 125
 AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg

130 135 140
 GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
 145 150 155 160
 TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
 165 170 175
 GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
 180 185 190
 CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
 195 200 205
 TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
 210 215 220
 GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
 245 250 255
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
 260 265 270
 TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 275 280 285
 GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
 290 295 300
 GAC GGC ACC ATC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC
 Asp Gly Thr Ile Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
 305 310 315 320
 CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
 325 330 335
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
 340 345 350
 GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
 355 360 365
 CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
 370 375 380
 ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala
 385 390 395 400
 CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT

Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
 405 410 415
 GCA GGC ACC GGA CGC
 Ala Gly Thr Gly Arg
 420

【0124】配列番号：6

配列の長さ：1263

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレバクテリウム フラバム

株名：MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-1263

特徴を決定した方法：E

他の情報：835 番目のR はG またはA を示し、836 番目、902 番目および923 番目のY はC またはT を示し、同時に、835 番目のR がG であり、836 番目、902 番目および923 番目のY がC であることはない。

【0125】

配列

GTGGCCCTGG TCGTACAGAA ATATGGCGGT TCCTCGCTTG AGAGTGGGA ACGCATTAGA 60
 AACGTGCTG AACGGATCGT TGCCACCAAG AAGGCTGAA ATAATGTCGT GGTGTCTGTC 120
 TCCGCAATGG GAGACACCAC GGATGAGCTT CTAGAATTG CTGCGGCAGT GAATCCCGTT 180
 CCGCCAGCTC GTGAAATGGA TATGCTCCTG ACTGCTGGTG AGCGTATTTC TAACGCTCTC 240
 GTGCCATGG CTATTGAGTC OCTGGGTGCA GAGGCTCAAT CTTTCACGGG TTCTCAGGCT 300
 GGTGTGCTCA CCACCGAGCG TCACGGAAC GCACGCATTG TTGATGTCAC TCCAGGTCGT 360
 GTGCGTGAAG CACTCGATGA GGGCAAGATC TGCATTGTTG CTGGTTTCCA GGGTGTCAAT 420
 AAGGAAACCC GCGATGTCAC CACGTTGGGT CCGCGTGTT CTGATACCAC TGCAGTTGCA 480
 TTGGCAGCTG CTCTGAACGC TGATGTGTGT GAGATTACT CAGATGTTGA CGGCGGTGAC 540
 ACCGCTGACC CGGCATCGT TCCTAATGCT CAGAAGCTGG AAAAGCTCAG CTTCAAGAA 600
 ATGCTGGAAC TTGCTGCTGT TGGCTOCAAG ATTTTGGTGC TACGCAGTGT TGAATACGCT 660
 CGTGCAATCA ATGTGCACT TCGGTACGC TCGTCTTATA GCAATGATCC CGGCACTTTG 720
 ATTGCGGCT CTATGGAGGA TATTCCTGTG GAAGAAGCAG TCCTTACCGG TGTCGCAACC 780
 GACAAGTCCG AAGCCAAAGT AACGTTCTG GGTATTTCCG ATAAGCCAGG CGAGRYTCCG 840
 AAGGTTTTCC GTGCGTTGGC TGATGCAGAA ATCAACATTG ACATGGTTCT GCAGAACGTC 900
 TYCTCTGTGG AAGACGGCAC CAYCGACATC ACGTTCACCT GCGCTCGCTC TGACGGACGC 960
 CGTGGATGG AGATCTTGAA GAAGCTTCAG GTTCAGGGCA ACTGGACCAA TGTGCTTTAC 1020
 GACGACCAGG TCGGCAAAGT CTCCTCGTG GGTGCGGGCA TGAAGTCTCA CCCAGGTGTT 1080
 ACCGAGAGT TCATGGAAGC TCTGCGCGAT GTCAACGTGA ACATCGAATT GATTTCACC 1140
 TCTGAGATCC GCATTCCGT GCTGATCCGT GAAGATGATC TGGATGCTGC TGCACGTGCA 1200
 CTGCATGAGC AGTTCAGCT GGGCGGCGAA GACGAAGCCG TCGTTATGC AGGCACCGGA 1260
 CGC 1263

【0126】配列番号：7

配列の長さ：421

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：プレバクテリウム フラバム

株名：MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-421

特徴を決定した方法：E

他の情報：279 番目のAAA はAla またはThr またはVal を示し、301 番目のYYYはSer またはPhe を示し、308 番目のZZZ はThr またはIle を示し、同時に、279 番目のAAA がAla であり、301 番目のYYY がSer であり、308 番目のZZZがThr であることはない。

【0127】

配列

Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
 1 5 10 15
 Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala

	20	25	30
Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp			
	35	40	45
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg			
	50	55	60
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu			
	65	70	75
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr			
	85	90	95
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg			
	100	105	110
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly			
	115	120	125
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg			
	130	135	140
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala			
	145	150	155
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val			
	165	170	175
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys			
	180	185	190
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly			
	195	200	205
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn			
	210	215	220
Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu			
	225	230	235
Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr			
	245	250	255
Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile			
	260	265	270
Ser Asp Lys Pro Gly Glu AAA Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp			
	275	280	285
Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val YYY Ser Val Glu			
	290	295	300
Asp Gly Thr ZZZ Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg			
	305	310	315
Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr			
	325	330	335
Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala			
	340	345	350
Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu			
	355	360	365
Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg			
	370	375	380
Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala			
	385	390	395
Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr			
	405	410	415
Ala Gly Thr Gly Arg			

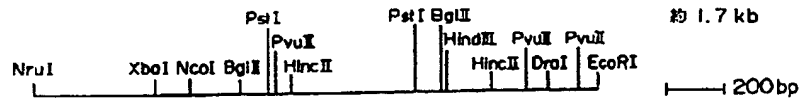
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のシーリジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の制限酵素による切断点地図。

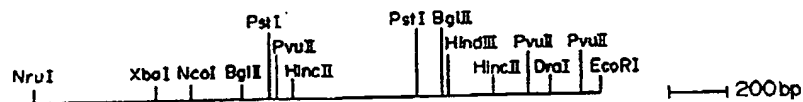
【図2】大きさが約1.7 kbの本発明DNA断片の塩基配列決定のための概略図。

【図3】本発明のプラスミドpCRY30-AK835の制限酵素切断点地図。

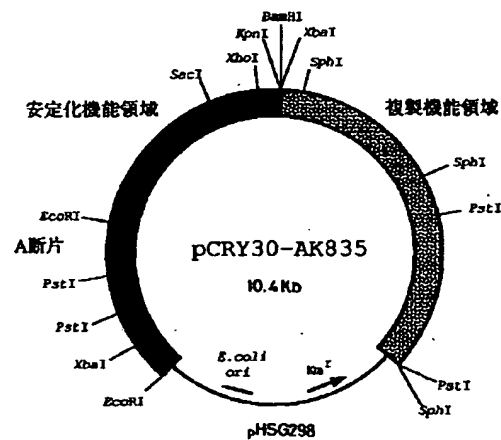
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵

(C 1 2 P 13/08

C 1 2 R 1:13)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(72)発明者 小浜 恵子
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号
三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 久留主 泰朗
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号
三菱油化株式会社筑波総合研究所内
(72)発明者 湯川 英明
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号
三菱油化株式会社筑波総合研究所内